

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

DIALOG(R)File 347:JAPIO  
(c) 2001 JPO & JAPIO. All rts. reserv.

04626765  
ANTIVIRAL AGENT

PUB. NO.: 06-298665 [JP 6298665 A]  
PUBLISHED: October 25, 1994 (19941025)  
INVENTOR(s): YAMANISHI KOICHI  
NAGAI KOZO  
MORIYAMA MASAMI  
APPLICANT(s): TORAY IND INC [000315] (A Japanese Company or Corporation),  
JP (Japan)  
APPL. NO.: 05-087267 [JP 9387267]  
FILED: April 14, 1993 (19930414)

#### ABSTRACT

PURPOSE: To provide an antiviral agent containing interferon as the active component and excellent in infection inhibitory effect and growth inhibitory effect on RNA virus.

CONSTITUTION: .alpha., .beta., .gamma. type interferons(IFN) are contained as the active components. As the IFNs, a natural type (e.g. human IFN-.alpha.), a chemically synthesized type, a type (e.g. human IFN-.alpha.) produced according to the gene recombination technique or a combination of .alpha., .beta., .gamma. type IFNs is used. Preparation is possible in the form of injection, capsule, nasal medicine, ointment, etc. The dosage is 50 to 9000000 unit, preferably 300 to 6000000 unit. This medicine is effective for an infectious disease caused by an RNA virus, especially a Fravivirus. If this medicine is used in combination with ribavirin as an RNA growth inhibitor, a further strong activity is exhibited.

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-298665

(43)公開日 平成6年(1994)10月25日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

A 6 1 K 37/66

識別記号

ADY G 8314-4C

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数3 OL (全 7 頁)

(21)出願番号

特願平5-87267

(22)出願日

平成5年(1993)4月14日

(71)出願人 000003159

東レ株式会社

東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

(72)発明者 山西 弘一

大阪府豊能郡豊能町光風台2丁目1番21号

(72)発明者 長井 幸三

東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

東レ株式会社東京事業場内

(72)発明者 森山 雅美

東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

東レ株式会社東京事業場内

(54)【発明の名称】 抗ウイルス剤

(57)【要約】

【構成】 インターフェロンを有効成分とするRNAウイルスに対する抗ウイルス剤。

【効果】 インターフェロンは、RNAウイルスに対する優れた感染阻害活性および増殖阻害活性を示し、抗ウイルス剤として有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 インターフェロンを有効成分とするRNAウイルスに対する抗ウイルス剤。

【請求項2】 RNAウイルスがフラビウイルスである請求項1記載の抗ウイルス剤。

【請求項3】 有効成分としてさらにリバビリンを含む請求項1または2記載の抗ウイルス剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、RNAウイルス、特にフラビウイルスによる感染症に対する抗ウイルス剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】抗ウイルス作用を有する薬剤として、アシクロビル（Acyclovir）、アラエ（Ara-A）やガンシクロビル（Ganciclovir）が知られている。これらの薬剤は、ウイルスの増殖過程のいずれかの段階を阻害することに基づくものである。

【0003】これらのウイルスの増殖過程が宿主細胞の代謝系に健在している薬剤は、正常な細胞代謝系の阻害に結びつき副作用が生じる。このような抗ウイルス剤以外のウイルスの増殖を酵素、構成蛋白、核酸合成過程で阻害する抗ウイルス剤の開発が望まれている。また、副作用の強い抗ウイルス剤と他剤併用により副作用軽減と抗ウイルス作用の増強による治療が望まれている。

【0004】B型肝炎ウイルス（HBV）、A型肝炎（HAV）による慢性肝炎以外の非A非B型肝炎（nonA nonB Hepatitis）、C型肝炎は、ウイルスがまだ分離されていない。しかし、C型肝炎の原因ウイルス（HCV）の遺伝子構造については、すでに1988年、Chiron社により解析が行われている。

【0005】HCVは、RNAウイルスのフラビウイルス属と考えられている。そのため、RNA同属ウイルスを用い感染実験を行い、HCVの増殖過程での阻害作用を解析し、有効な治療、予防を検討することが必要である。

【0006】フラビウイルス属には、日本脳炎、デング熱、黄熱、セントルイス脳炎、西ナイル熱、ロシア春夏脳炎、跳躍病などが知られている。

【0007】HCVの遺伝子構造と類似している日本脳炎ウイルス（Japanese encephalitis virus）は、日本脳炎の原因ウイルスであり、RNAウイルスでコガタアカイエカ、アカイエカが媒介昆虫となり、ヒトでは2000人に1人ぐらいの割合で発症し、30%以上の死亡率を示し、回復後も30%は後遺症を残す。日本では8、9月に発生し、ベトナム、台湾では季節を問わず発生する。後遺症として、性格の変化、痴呆、神経障害、麻痺などがあり、重篤な疾患である。

【0008】また、類似しているHCVは日本の肝炎患者100万人のうち2%程度であり、ウイルス感染によ

る肝癌のうち70%がHCVによるものと考えられている。感染者は慢性肝炎から肝硬変を経て肝癌になることが考えられ、治療、予防の必要なウイルスである。

## 【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、フラビウイルスに対し有効な抗ウイルス剤、および有効な併用治療を提供することを目的とする。

## 【0010】

【課題を解決するための手段】前記目的は、以下の本発明により達成される。すなわち本発明は、インターフェロンを有効成分とするRNAウイルス、特にフラビウイルスによる感染症に対する抗ウイルス剤である。

【0011】本発明に用いられるIFNは、 $\alpha$ 、 $\beta$ または $\gamma$ 型のものであり、天然型、化学合成により製造されるもの、遺伝子組換え技術により製造されるもののいずれであってもよい。天然型のものでは、ヒト白血球により産生されるヒトIFN- $\alpha$ 、ヒト2倍体線維芽細胞によって産生されるヒトIFN- $\beta$ 、遺伝子組換え技術のものでは、ヒトIFN- $\alpha$ 、ヒトIFN- $\beta$ 、ヒトIFN- $\gamma$ などを例示することができる。これら $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 型のIFNは組み合わせることもまた有効である。

【0012】さらに、本発明は他の抗ウイルス剤、肝臓薬などと組み合わせて使用することもできる。併用する抗ウイルス剤としては、アシクロビル、ピダラビン（“アラセナーA”）、リバビリンなどが、また肝臓薬としては、アミノエチルスルホン酸（“タウリン”）、強力ミノファゲンC、小柴胡湯などが好ましく用いられ、その他にはサイクロスポリンなどが好ましく用いられる。これらの中では、特にリバビリンが好ましく用いられる。

【0013】本発明の抗ウイルス剤には、必要により安定剤を添加することができる。そのような安定剤としては、ヒト血清アルブミン、特開昭58-92619号に開示されたポリオール、特開昭58-92621号に開示された有機酸緩衝剤などを例示することができる。さらに、投与方法に応じて常用の担体などを適宜混合して製剤化できることは言うまでもない。本発明の有効成分として含まれるIFNには種特異性があるから、ヒトに投与する場合にはヒトIFNを、他の動物に投与する場合には当該同一種の動物のIFNを使用する必要がある。剤型としては、注射剤、カプセル剤、経鼻剤、軟膏剤など種々の形態のものが用いられる。

【0014】投与量は、投与対象、投与方法、症状などに応じ適宜決定されるが、一般には50~900万単位、特に300~600万単位の範囲で投与される。

## 【0015】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

実施例1

インターフェロンによる日本脳炎ウイルスの感染、増殖阻害：各種インターフェロンを用い、日本脳炎ウイルスに対する感染阻害実験および増殖阻害実験を行った。使用したインターフェロン、細胞ウイルス、培養液は以下の通りである。

【0016】インターフェロン：

(1) Natural Human Interferon- $\alpha$  (HIFN- $\alpha$ )、(アマシャム社、Lot No. IF1-10530)

(2) Recombinant-DNA Alpha (ReIFN- $\alpha$ )、(アマシャム社、Cat No. IF7)

(3) Human Fibroblast Interferon (IFN- $\beta$ )、(東レ(株)製“フエロン” Lot No. L-0931)

(4) Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (特開昭58-90514に記載の方法により製造したもの)

【0017】細胞：FL細胞(ヒト羊膜細胞)

ウイルス：北京-1株(現在、日本脳炎ワクチン株として使用されている。)

ストックウイルスは、感染マウス脳の10%homogenateを低速遠心し、その上清を使用した。感染価は $5.4 \times 10^7$  FFU (Focus forming unit) / ml。

【0018】培養液：

増殖培地——MEM+10% Fetal bovine serum (FBS)

維持培地——MEM+2% FBS

【0019】感染阻害実験：FL細胞を96穴マイクロプレートに分散した。1~2日後に単層となったので、上清を捨て、維持培地中で階段希釈された各種インターフェロンを加えて24時間インキュベートした。インキュベート後、インターフェロンを捨ててPBSで細胞をよく洗い、適当に希釈されたストック日脳ウイルスを0.025 ml / well づつ細胞に加えて感染させた。24時間後に細胞をエタノールで固定し、PAP法(酵素抗体法の一法)でフォーカスを染色した。フォーカス数を計数し、フォーカス減少率をコントロールのフォーカス数と比較して求めた。詳細は、日本脳炎ウイルスの迅速中和抗体価測定法(Arch. Virol. 86, 129-135, 1985)に従った。

【0020】結果を図1に示す。図1から明らかなように、すべてのインターフェロンが日本脳炎ウイルスに対して感染阻害活性を示した。HIFN- $\alpha$ 、ReIFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ は強い感染阻害活性があったが、中でもReIFN- $\alpha$ が最も強い感染阻害活性を示した。IFN- $\gamma$ は他の3種類のインターフェロンに比べ感染阻

害活性が弱く、100 IU/ml以上の濃度ではじめて100%の感染阻害を示した。

【0021】増殖阻害実験：24穴マイクロプレート中にFL細胞を単層培養した。これに、10倍階段希釈した各種インターフェロンを加え、24時間インキュベートした。インキュベート後、インターフェロンを捨て、細胞をPBSでよく洗い、日脳ウイルスを $1.0 \times 10^5$  / well づつ感染させた。2日後に感染細胞の上清を分取し、上清中のウイルス感染価を上述のフォーカス計数法によって測定した。

【0022】結果を図2に示す。図2から明らかなように、インターフェロンの日本脳炎ウイルスに対する増殖阻害は、感染阻害実験による結果と同様の傾向が見られた。HIFN- $\alpha$ 、ReIFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ は、ほぼ同程度に10 IU/ml以上で強い増殖阻害を示したが、IFN- $\gamma$ は他の3種類のインターフェロンに比べ増殖阻害活性は弱かった。

【0023】実施例2

各種薬剤による日本脳炎ウイルスの感染、増殖阻害：以下に示す薬剤を用い、日本脳炎ウイルスに対する感染阻害実験および増殖阻害実験を行った。細胞、ウイルス、培養液は実施例1と同様のものを使用した。

【0024】使用薬剤：

(1) サイクロスポリン(サンディミュン注射液)

0.25 g / 5 ml そのまま使用。

(2) “タウリン”

1袋を5 mlのMEMに溶解、上清を使用。

(3) リバビリル

1 capsule を5 mlのMEMに溶解、上清を使用。

(4) 強力ミノファージェンC (1アンプル 5 ml)

そのまま使用。

(5) 小柴胡湯

1袋を10 mlのMEMに溶解、上清を使用。

(6) アシクロビル(ゾビラックス)

1バイアルを10 mlのMEMで溶解。完全に溶ける。

(7) “アラセナーA”

1バイアルを30 mlのMEMで溶解。懸濁液となる。

【0025】感染阻害実験：実施例1と同様の方法で行った。50%以上のフォーカス減少率を示す最大の希釈倍数の逆数を、その薬剤の感染阻害価とした。結果を表1に示す。

【0026】

【表1】

10

20

30

40

## 各種薬剤の日本脳炎ウイルスに対する感染阻害

薬 剤 名	感 染 阻 害 価	細胞障害作用*
サイクロスポリン	< 4 0 9 6	1 0 2 4
タ ウ リ ン	< 8	2
リバビリン	5 1 2	2
強力ミノファージェンC	< 3 2	8
小 柴 胡 湯	< 8	2
アシクロビル	< 8	2
アラセナーA	< 3 2	8

## \* 細胞障害を示す薬剤の最大希釈倍数の逆数

表1から明らかなように、リバビリンだけに感染阻害活性が認められた。

【0027】増殖阻害実験：96穴マイクロプレートにFL細胞を単層培養した。これに、日本脳炎ウイルスを50FFU/wellづつ感染させた。37℃、2時間の吸着後、細胞をPBSで洗い、4倍階段希釈した各種薬剤を含んだMEMで細胞を培養した。24時間後に培\*

\*養液を捨て、PBSで洗浄後アルコール固定し、PAP染色を行った。50%以上のフォーカス減少率を示す最大の希釈倍数の逆数を、その薬剤の増殖阻害価とした。結果を表2に示す。

【0028】

【表2】

## 各種薬剤の日本脳炎ウイルスに対する増殖阻害

薬 剤 名	感 染 阻 害 価	細胞障害作用
サイクロスポリン	< 3 2 3 8 4	8 0 9 6
タ ウ リ ン	< 8	2
リバビリン	2 0 4 8	2
強力ミノファージェンC	3 2	2
小 柴 胡 湯	< 3 2	8
アシクロビル	< 8	2
アラセナーA	< 3 2	8

感染阻害実験とほぼ同様の結果であった。リバビリンが強い増殖阻害活性を示し、強力ミノファージェンCに若干の増殖阻害活性を認めた。

【0029】実施例3

インターフェロンとリバビリン併用による日本脳炎ウイ

ルスの感染阻害：インターフェロンα、βとリバビリンとの併用による効果を検討した。使用した薬剤は以下の通りである。細胞、ウイルスは実施例1と同様のものを用いた。

【0030】インターフェロン：インターフェロンα

(IFN- $\alpha$ ) = Recombinant-DNA Alpha (ReIFN- $\alpha$ ), (実施例1と同様のもの)

インターフェロン $\beta$  (IFN- $\beta$ ) = Human Fibroblast Interferon (IFN- $\beta$ ), (実施例1と同様のもの)

リバビリン: 1 capsule を 5 ml の MEM に溶解、上清を使用。

【0031】感染阻害実験: 上記インターフェロンを  $1 \times 10^4$  IU/ml に調整し、これを原液とした。この原液を4倍階段希釈して使用した。リバビリンも上清を原液とし、これを4倍階段希釈して使用した。階段希釈 10 されたインターフェロンとリバビリンを box dilution \*

リバビリンの濃度変化によるインターフェロンの感染阻害価

リバビリンの希釈倍数	インターフェロンの感染阻害価	
	IFN- $\alpha$	IFN- $\beta$
$2^7$	$2^{16}$	$2^{12}$
$2^9$	$2^{16}$	$2^{12}$
$2^{11}$	$2^{16}$	$2^{12}$
$2^{13}$	$2^{14}$	$2^{10}$
$2^{15}$	$2^{14}$	$2^{10}$
—	$2^{14}$	$2^{10}$

【0033】

30 【表4】

\*し、96穴マイクロプレート内のFL細胞に加え、24時間インキュベートした。インキュベート後、上清を捨て、PBSで細胞をよく洗い、日脳ウイルスを感染させた。24時間後に細胞をエタノールで固定し、PAP法でフォーカスを染色した。フォーカス減少率をコントロールのフォーカス数と比較して求め、50%以上のフォーカス減少率を示す薬剤濃度の最高希釈倍数を、その薬剤の感染阻害価とした。

【0032】結果を表3および表4に示す。

【表3】

## インターフェロンの濃度変化によるリバビリンの感染阻害価

インターフェロンの希釈倍数		リバビリンの感染阻害価	
I F N - $\alpha$	$2^{16}$		$2^{11}$
	$2^{18}$		$2^9$
	$2^{20}$		$2^9$
	$2^{22}$		$2^9$
	$2^{24}$		$2^9$
	—		$2^9$
I F N - $\beta$	$2^{12}$		$2^{11}$
	$2^{14}$		$2^9$
	$2^{15}$		$2^9$
	$2^{18}$		$2^9$
	$2^{20}$		$2^9$
	$2^{22}$		$2^9$
	$2^{24}$		$2^9$
	—		$2^9$

## 【0034】

【発明の効果】本発明の抗ウイルス剤は、RNAウイルスのフラビウイルス属に対し、感染阻害活性および増殖阻害活性を示し、またRNA増殖阻害剤であるリバピリンとの併用により、さらに強い活性を示した。

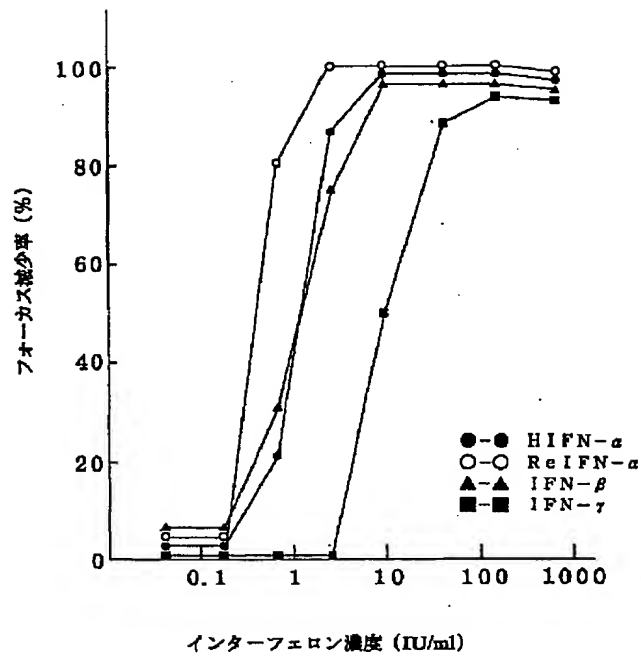
## 【図面の簡単な説明】

【図1】 インターフェロンによる日本脳炎ウイルスの感染阻害実験結果を示す。

【図2】 インターフェロンによる日本脳炎ウイルスの増殖阻害実験結果を示す。



【図1】



【図2】

